

## A mikroorganizmus szimbiózisok jelentősége a légköri nitrogén megkötésében a talajban

T. A. KALININSZKAJA

*Szovjet Tudományos Akadémia Mikrobiológiai Intézete, Moszkva*

A nitrogénkötő baktériumok tevékenysége rendkívül fontos a talaj nitrogénnel való ellátásában. Nagy jelentőségű az, hogy milyen baktériumfajoknak tulajdonítható a talajban végbemenő közvetlen N-kötés.

A szabadon élő N-kötők új formáinak tanulmányozása, amelyet FJODOROV és mi kezdtünk el, azt mutatja, hogy az egyik legelterjedtebb szabadon élő N-kötő csoport sajátos vonása az, hogy fejlődésük és N-kötésük szimbiózisban történik más talajmikroorganizmusokkal.

Szimbiotikus kapcsolatok más mikroorganizmusokkal annyira jellemző vonásuk, hogy mi mint a légköri nitrogén fakultatív-szimbiotrof megkötőről beszélhetünk.

A fakultatív N-kötőket először FJODOROV és mi fedeztük fel gyepes podzol talajon [2]. További kutatások rávilágítottak ezen mikroorganizmusok széleskörű elterjedésére a legkülönbözőbb talajtípusokban. Számuk 10 és 100 000-es nagyságrendben mérhető, de nem ritkán eléri a néhány millió sejtet is, 1 g talajban. Az 1. táblázat a különböző talajtípusokban talált szimbiotrof nitrogénkötők mennyiségéről közöl adatokat.

Ezek a mikroorganizmusok hosszú ideig elkerülték a kutatók figyelmét annak következtében, hogy egy sor sajátosság erősen megkülönbözteti őket más ismert aerob N-kötőktől. E sajátosságok közül a következőket említhetjük meg:

1. Tiszta tenyészetben standard, N-t nem tartalmazó közegben nőni nem képesek.
2. Szénhidrátokat szénforrásként a legtöbb tenyészet nem képes felhasználni.
3. Sok N-kötőnél — B vitaminokkal szembeni igény.
4. N-kötés jelentős serkentése más mikroorganizmusokkal való szimbiotikus asszociációban.

A szimbiotikus létformához való alkalmazkodás nem fosztotta meg ezeket a mikroorganizmusokat attól a képességüktől, hogy tiszta tenyészetben is fixálni tudjanak légköri nitrogént. A kutatott fakultatív szimbiotrof N-kötők többségénél tisztázódtak a sikeres N-kötés feltételei, tiszta tenyészetben.

Meg kell jegyeznünk, hogy a N-megkötő mikrobák szimbiózisai kevésbé specifikusak. Számos mikroorganizmus képes serkentő hatást gyakorolni a N-kötésre. Ezek a mikrobák asszociációiban található serkentő mikroorganizmusok általában a *Pseudomonas*, *Archromobacter*, *Flavobacterium* nemzetséghez tartoznak.

1. táblázat

## Különböző talajtípusok fakultatív-szimbiotrof N-kötőinek száma

(1) Talajtípus	(2) Szimbiotrof N-kötők száma 1000-ben/1 g talaj
a) Gyepes-podzoltalaj, szántóföld. (Moszkvai terület)	45
b) Csernozjom, szántóföld, kameni sztyepp	450
c) Sötét szerozjom, Üzbegisztán	950
d) Réti-láptalaj, rizs, Kubáni kísérleti állomás	4500
e) Krasznoszjom, tea, Grúzia	200

Elég gyakran ezek a stimuláló mikrobák az *Agrobacterium radiobacter*-hez tartoznak. A 2. táblázat tartalmazza a különböző mikroorganizmusoknak a N-kötő *Mycobacterium*okra kifejtett serkentő hatását illusztráló adatokat.

2. táblázat

## Néhány mikroorganizmus serkentő hatása a mycobaktériumok N-megkötésére

(1) N-kötők	(2) Serkentő mikro- organizmusok	(3) Glükóz g felhasználás 30 ml közegre	(4) A megkötött légköri-N mg-ban	(5) A megkötött N mennyisége N mg/1 g C-forrás
Mycobacterium flavum 301	Ø	0,00	0,00	—
	Ps. fluorescens	0,28	4,08	14,59
	Bacillus subtilis	0,32	4,76	14,89
Mycoplana roseo-alba 368	Ø	0,02	0,00	—
	Flacobacterium fulvum 216	0,28	3,34	11,93
	Ps. radiobacter B. 28	0,29	3,27	11,27

A kísérletet glükózzal és élesztő autolizátummal elkészített táptalajon végeztük (15 mg N autolizátum/iter). A kísérlet tartama 30 nap.

A serkentő mikroorganizmusok a következő funkciókat végzik:

1. N-kötők által igényelt vitaminok szintézisét.
2. A N-kötők számára felvehető szénforrások (pl. szénhidrátok) átalakítását hasznosítható vegyületekké.
3. Oxigénfelesleget felhasználva a környező közegben oxido-redukciós feltételeket hoznak létre, amelyek kedvezőek a N-kötésre.

N-kötők által a környező közegbe kiválasztott sejten kívüli N-tartalmú vegyületeket a kísérő mikroflóra N-forrásként használja fel. A szimbiotrof N-kötő legtipikusabb képviselői a talaj mycobaktériumok csoportjához tartoznak.

Mozdulatlanok, ritkán mozgók, Gram-negatív, nem saválló, változó alakú pálcikák. Gyakran duzzadt végű sejtek és meggörbült formák is találhatóak. Jellemző a poláris metakromatikus granulumok jelenléte. A sejtek öregedését általában nem kíséri rövidülés vagy gömb alakúvá történő átalakulás.

KRASZILNIKOV Szovjetunióban elfogadott klasszifikációja szerint ezeket a mikroorganizmusokat a *Mycobacterium* nemzetségbe soroljuk, amely magába foglalja BERGEY *Corynebacterium* és az *Arthrobacter* nemzetsége is.

Az általunk kutatott mikroorganizmusok legközelebb a JENSEN által leírt talaj *Corynebacterium*okhoz állnak [1].

A mozgó formákat a *Mycoplana* nemzetséghez soroljuk. Fentebb már említettük, hogy a N-kötő mikrobaktériumok túlnyomó többsége a szénhidrátokat nem képes felhasználni. Főbb szénforrásként szerepel az etilalkohol, tejsav, vajsav, glikolsav és más szerves savak.

Az általunk tanulmányozott összes N-kötő mikrobaktériumra jellemző a N-kötés erős gátlása, ha az aeráció nagyon jelentős, bár ezek a mikroorganizmusok obligát aerobok. Ez az effektus egészen specifikus erre a szimbiotrof nitrogénmegkötők csoportjára nézve, és élesen elkülöníti őket olyan aerob N-kötőktől, mint az *Azotobacter* vagy a *Beijerinckia*.

A N-kötő mikrobaktériumokat 3 csoportra lehet felosztani azoknak a feltételeknek alapján, amelyek a tiszta tenyészetben történő N-kötéshez elengedhetetlenek.

Az első csoport mikroorganizmusai, amelyekhez a *Mycobacterium flavum* tartozik, vitaminokat igényelnek (biotint). Vitaminok és a számukra legkedvezőbb szénforrás (etanol, glikolsav) jelenlétében ezek a mikroorganizmusok fejlődnek és N-kötést végeznek N-mentes táptalajokon is.

A második csoport képviselői, amelyekhez a *Mycoplana roseo-alba* tartozik, nem igényelnek vitaminokat, de a N-megkötés sikeres lefolyásához a környező közegben kis mennyiségben (10–15 mg N/l) megkötött N-vegyület — pl.  $\text{NH}_4$  vagy  $\text{NO}_3$  jelenléte szükséges.

Végül a N-kötő mikobaktériumok 3. csoportja tiszta tenyészetben csak élesztő autolizátum jelenlétében köti meg a légköri nitrogént és jelentősen stimulálja a N-kötést más mikroorganizmusok jelenléte.

A N-kötésre vonatkozó adatokat mykobaktériumok tiszta tenyészetében a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat

## N-kötés mykobaktérium tiszta tenyészetében

(1) Felhasznált törzsek	(2) Táptalaj	(3) Felhasznált szénforrás C g/30 ml közeg	(4) Megkötött légköri N mg	(5) A megkötött N mennyisége N mg/l g C-forrás
<i>Mycobacterium flavum</i> 301	N-mentes közeg, glikolsavval és biotinnal (10 $\mu$ /l)	0,170	3,3	19,40
<i>Mycoplana roseo-alba</i> 368	Közeg 10 mg $\text{NH}_4/\text{N}$ l szénforrás-laktát	0,150	1,6	10,67
<i>Mycobacterium invisibile</i> n. sp. 571	Élesztő automatizátumos közeg vitaminokkal, szénforrás-laktát	0,070	0,6	8,57

Ezzel kapcsolatban érdeklődésre tarthat számot a cellulózbontó baktériumok és a fakultatív-szimbiotrof N-kötők közötti szimbiózis lehetőségének tanulmányozása. Cellulózt és nem nagy élesztő autolizátum dózist tartalmazó

## 4. táblázat

## Cellulózon fejlődő szimbiotikus mikroba asszociációk N-megkötése

(1) Talajtípus, amelyből az asszociációt kitenyésztettük	(2) Felhasznált cellulóz g/30 ml közeg	(3) Megkötött légköri N mg/30 ml közeg	(4) A megkötött N mennyisége N mg/l g felhasz- nált cellulóz
a) Gyepes-podzol, moszkvai terület	0,228	2,03	8,9
b) Réti csernozjom, Kazah SzSzk	0,225	2,5	11,1
c) Szerozjom, Üzbég SzSzk	0,208	2,65	12,7
d) Rizsföld, Kubány, Kísérleti áll.	0,161	2,96	18,4

közeget használva mi különböző talajokból cellulózbontó- és N-kötő baktérium asszociációt választottunk ki, amely cellulóz lebontásával aktívan kötötte meg a légköri N-t.

Hasonló mikrobakomplexumok N-kötésre vonatkozó adatait a 4. táblázat tartalmazza. A legaktívabb asszociációkat a rizsföldek talaja adta.

Cellulózbontó baktériumok ezekben az asszociációkban sajátos spóra nélküli anaerob mikroorganizmus csoportot alkotnak, amelyek cukrok és szerves savak felhalmozásával bontják a cellulózt, de gáznemű termékeket nem képeznek.

Hasonló asszociációkban a N-kötést mykobaktériumok végzik. Ezekben a mikroba asszociációkban jelentős szerepet játszanak a kísérő mikroorganizmusok, amelyek serkentik úgy a nitrogénkötő, mint a cellulózbontó baktériumok fejlődését.

Hasonló bonyolult mikrobakomplexumok működése fontos szerepet játszhat a talaj légköri nitrogénnel való gazdagításában, a növényi maradványok lebomlása segítségével.

## Összefoglalás

A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a szabadon élő nitrogénkötő mikroorganizmusok leginkább elterjedt csoportját az összes tanulmányozott talajokban a fakultatív nitrogénkötők képezik, amelyeknek a száma néhány tízezer és néhány millió között ingadozik 1 g talajra átszámítva.

E nitrogénkötők jellemző sajátossága, hogy természetes körülmények között más mikroorganizmusokkal együttélésben növekednek és kötik meg a nitrogént. Ezek közül a mykobaktériumoknak van alapvető jelentőségük. Ezeket az jellemzi, hogy növekedésükhöz vitaminokat és kis mennyiségű nitrogénvegyületet igényelnek, a szénhidrátokat szénforrásként nem értékesítik, valamint az erős aeráció lényeges mértékben gátolja a nitrogénkötést. A kísérő mikroorganizmusok a nitrogénkötők növekedéséhez szükséges vitaminokat és más serkentő anyagokat szintetizálnak, átalakítják az előbbieket számára nem értékesíthető szénforrásokat felvehetővé, s a felesleges oxigén felhasználásával kedvező redox viszonyokat hoznak létre. A serkentő mikroorganizmusok között a *Bacterium radiobacter*, *Pseudomonas* és *Flavobacterium* a leggyakoribbak. Kedvező körülmények között a nitrogénkötő mykobaktériumok tiszta tenyészetben is jelentős mennyiségű nitrogént képesek megkötni.



Természetes körülmények között a nitrogénkötő mikroorganizmusok tevékenységét lényeges mértékben befolyásolják a cellulózbontó baktériumok. Különböző talajokból sikerült kitenyészteni a nitrogénkötő mykobaktériumok és a cellulózbontó baktériumok asszociációját, melynek során az előbbieket 12–14 mg nitrogént kötöttek meg 1 g elbontott cellulózra átszámítva. Különösen a rizsföldek talajaiból sikerült kitenyészteni ilyen típusú együttélést.

### Irodalom

- [1] BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 6<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1948.  
 [2] FEDOROV, M. B. & KALININSKAYA, T. A.: Azotfikszirujuscsaja aktivnoszt' szmesan-nüh kul'tur oligonitofil'nüh mikroorganizmov. Mikrobiologija. **28**, 343–351. 1959.

Érkezett: 1968. szeptember 18.

## The Importance of Microorganism Symbiosis in the Fixing of Atmospheric Nitrogen in the Soil

[T. A. KALININSKAYA

Microbiology Institute of the Academy of Sciences, U.S.S.R. Moscow

### Summary

According to the results of the investigations the facultative N-fixing microorganisms constitute the most widespread group of the free-living N-fixing microbes in all studied soils. Their number fluctuates between a couple of ten thousands and a few millions in 1 g soil.

A characteristic property of such nitrogen fixing microorganisms is that under natural conditions they live together with other microorganisms growing and fixing nitrogen. From among these, the mycobacteria are of fundamental importance. It is characteristic of these that they require vitamins and small amounts of nitrogen compounds for their growth. They do not utilize carbohydrates as carbon source and the strong aeration inhibits their nitrogen fixation to a significant extent.

The accompanying microorganisms synthesize vitamins and other stimulating substances required for the growth of nitrogen fixing microorganisms. Besides this, they transform the unutilizable C-source to an available form, and, by using the surplus oxygen, bring about advantageous redox conditions for the nitrogen fixing microbes. Among the stimulating microorganisms, *Bacterium radiobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, are the most frequent. Under favourable conditions, the nitrogen fixing mycobacteria in pure cultures are capable of fixing significant amounts of nitrogen, too.

Under natural conditions, the activity of the nitrogen fixing microorganisms is considerably influenced by the cellulose decomposing bacteria. It was possible to isolate the association of nitrogen fixing mycobacteria and cellulose decomposing bacteria from different soils. In this association, the former fixed 12–14 mg nitrogen, corresponding to 1 g decomposed cellulose. This type of symbiosis was isolated successfully especially from paddy soils.

*Table 1.* The number of the facultative symbiotic N-fixers in the different soil types. (1) Soil types: *a*) demo-podzolic soil, ploughed field, *b*) Chernozem ploughed field of Kamennaya steppe. *c*) Dark chernozem. Meadow peaty soil, rice. *e*) Red earth tea. (2) Number of symbiotic N-fixing microorganisms 1000/g soil.

*Table 2.* The stimulative effect of some microorganisms on the nitrogen fixation of mycobacteria. (1) N-fixing microorganisms (2) Stimulating microorganisms. (3) Glucose utilization g/30 ml media. (4) The fixed N in mg. (5) The fixed N mg/1 g C-source.

Table 3. The N-fixation in pure cultures of mycobacterium. (1) Investigated strains. (2) The variants of the culture solution. (3) The used C-source C g/30 ml medium. (4) The fixed atmospheric N mg. (5) The fixed N mg/1 g C-source.

Table 4. The nitrogen fixed by the symbiotic microbe association developing on cellulose. (1) Soil type from which the association was isolated. c-d see Table 1. (2) Used cellulose g/30 ml medium. (3) Fixed atmospheric N mg/30 ml medium. (4) Fixed N mg/1 g used cellulose.

## Bedeutung der Symbiose von Mikroorganismen in der Bindung des Luftstickstoffes im Boden

T. A. KALININSZKAJA

Mikrobiologisches Institut der Akademie der Wissenschaften in der UdSSR, Moskau

### Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die fakultativen Stickstoffbinder — deren Zahl zwischen einigen Zehntausend und einigen Millionen pro 1 g Boden schwankt — die am meisten verbreitete Gruppe der freilebenden stickstoffbindenden Mikroorganismen aller untersuchten Böden bilden.

Diese Stickstoffbinder sind dadurch charakterisiert, dass sie unter natürlichen Bedingungen mit anderen Mikroorganismen in Symbiose wachsen und den Stickstoff auf diese Weise binden. Von ihnen sind die Mykobakterien von grundlegender Bedeutung. Charakteristisch für sie ist ihr Anspruch auf Vitamine und in kleineren Mengen auf Stickstoffverbindungen zum Wachsen, sie können die Kohlenhydrate nicht als Kohlenstoffquelle verwenden und eine starke Aeration hindert ihre Stickstoffbindung bedeutend. Die begleitenden Mikroorganismen synthetisieren die zum Wachsen der Stickstoffbinder nötigen Vitamine und andere Stimulatoren, bilden für sie die Kohlenstoffquellen in aufnehmbare Formen um und schaffen durch den Verbrauch des überflüssigen Sauerstoffes vorteilhafte redox Verhältnisse. Die am häufigsten vorkommenden stimulierenden Mikroorganismen sind *Bacterium radiobacter*, *Pseudomonas* und *Flavobacteria*. Unter günstigen Verhältnissen vermögen die stickstoffbindenden Mykobakterien auch in Reinkulturen bedeutende Stickstoffmengen zu binden.

Unter natürlichen Verhältnissen wird die Tätigkeit der stickstoffbindenden Mikroorganismen in grossem Masse von den zelluloseabbauenden Bakterien beeinflusst. Es gelang die Assoziation der stickstoffbindenden Mykobakterien und der zelluloseabbauenden Bakterien aus verschiedenen Böden zu isolieren. In dieser Assoziation haben die stickstoffbindenden Bakterien 12—14 mg N/1 g abgebaute Zellulose gebunden. Besonders aus den Böden von Reinkulturen gelang es solche Symbiosen zu isolieren.

Tab. 1. Zahl der fakultativen-symbiotischen Stickstoffbinder in verschiedenen Bodentypen. (1) Bodentyp: a) Rasenpodsolboden, Ackerland; b) Tschernosem, Ackerland, Kamennaja Steppe; c) dunkler Serosom; d) Wiesenmoorboden, Reis; e) Krasnosern, Tee; (2) Zahl der symbiotischen Stickstoffbinder:  $\times 1000/1$  g Boden.

Tab. 2. Stimulierende Wirkung einiger Mikroorganismen auf die Stickstoffbindung der Mykobakterien. (1) Stickstoffbinder; (2) stimulierende Mikroorganismen; (3) Glykoseverbrauch (in g) aus 30 ml Medium; (4) gebundener Luftstickstoff in mg; (5) Produktivität der N-Bindung, mg N/1 g Kohlenstoffquelle.

Tab. 3. Stickstoffbindung der Mykobakterien in Reinkultur. (1) Stämme; (2) Varianten der Nährlösung; (3) verbrauchte Kohlenstoffquelle, g C/30 ml Medium; (4) gebundener Luftstickstoff in mg; (5) Produktivität der N-Bindung, mg N/1 g Kohlenstoffquelle.

Tab. 4. Stickstoffbindung der auf Zellulose gewachsenen symbiotischen Mikrobenassoziationen. (1) Bodentyp, aus dem die Assoziation isoliert wurde, a) — d) s. Tab. 1.; (2) Zelluloseverbrauch, g/30 ml Medium; (3) gebundener Luftstickstoff, mg N/30 ml Medium; (4) Produktivität der N-Bindung, mg N/1 g verbrauchte Zellulose.

# Роль микробных симбиозов в процессах биологической фиксации азота в почве

Т. А. КАЛИНИНСКАЯ

Институт Микробиологии АН СССР, Москва

## Резюме

Данные анализов показывают, что одной из наиболее распространенных групп свободноживущих азотфиксаторов является своеобразная группа азотфиксирующих микроорганизмов, о которых мы можем говорить как о факультативно-симбиотрофных фиксаторах атмосферного азота. Численность их измеряется десятками и сотнями тысяч клеток, а нередко достигает нескольких миллионов клеток на 1 г почвы.

Наиболее характерной чертой их является то, что они развиваются и фиксируют азот в симбиозе с другими почвенными организмами. Среди них главное значение имеет микобактер.

Эти микроорганизмы сильно отличаются от других известных аэробных азотфиксаторов. Среди таких особенностей можно указать на следующие: 1. Неспособность расти на стандартных безазотных средах в условиях чистой культуры. 2. Недоступность углеводов как источников углерода для подавляющего числа культур. 3. У многих азотфиксаторов — потребность в витаминах группы В. 4. Значительная стимуляция азотфиксации в симбиотических ассоциациях с другими микроорганизмами.

Микроорганизмы-стимуляторы синтезируют витамины, необходимые азотфиксаторам, перерабатывают недоступные для азотфиксаторов источники углерода (например углеводы) в доступные для них соединения. Потребляя избыток кислорода, создают в окружающей среде окислительно-восстановительные условия, благоприятные для азотфиксации.

Микроорганизмы-стимуляторы, встречающиеся в микробных ассоциациях, относятся обычно к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*. Довольно часто микробами-стимуляторами являются штаммы *Agrobacterium radiobacter*.

Приспособление к симбиотическому существованию не лишило эти микроорганизмы способности фиксировать азот в условиях чистой культуры.

В природных условиях на деятельность азотфиксирующих микроорганизмов в значительной степени оказывают влияние целлюлозоразлагающие бактерии. Из разных почв выделили ассоциации целлюлозоразлагающих и азотфиксирующих бактерий, которые активно фиксировали атмосферный азот за счет разложения целлюлозы.

Наиболее активные ассоциации были выделены из почв рисовых полей.

Табл. 1. Численность факультативно-симбиотрофных азотфиксаторов в почвах разного типа. (1) Тип почвы. а) Дерново-подзолистая почва, пашня. б) Чернозем, пашня. Каменная степь. с) Темный серозем, Узб. ССР. d) Лугово-болотная почва, Кубанская опытная станция, рис. е) Краснозем, чай. (2) Симбиотрофные азотфиксаторы, в тысячах на 1 г почвы.

Табл. 2. Стимулирующее влияние некоторых микроорганизмов на фиксацию азота микобактериями. (1) Азотфиксаторы. (2) Стимулирующие микроорганизмы. (3) Потребление глюкозы в г на 30 мл среды. (4) Фиксировано азота атмосферы в мг. (5) Продуктивность азотфиксации в мг на 1 г источника углерода.

Табл. 3. Фиксация азота чистыми культурами микобактерий. (1) Используемые штаммы. (2) Вариант питательной среды. (3) Потреблено источника С, в г на 30 мл среды. (4) Фиксировано азота атмосферы в мг. (5) Продуктивность азотфиксации в мг на 1 г источника С.

Табл. 4. Фиксация азота симбиотическими микробными ассоциациями, развивающимися на клетчатке. (1) Почва, из которой выделены ассоциации а) — d) смотри в таблице 1. (2) Потреблено клетчатки, в г на 30 мл среды. (3) Фиксировано азота атмосферы, мг на 30 мл среды. (4) Продуктивность азотфиксации, мг азота на 1 г потребленной клетчатки.